

? s pn=jp 2002348291

S6 2 S PN=**JP 2002348291**

? t s6/3,ab,ls/all

>>>W: Some display codes not found in file 347: LS

347.7479773 \$1.85 US

JAPIO

(c) 2004 JPO & JAPIO. All rights reserved.

6/3,AB,LS/1 (Item 1 from file: 347)

**07479773 NEW DIOXIN ANALOG AND METHOD AND KIT FOR SEARCHING DIOXINS
DECOMPOSER ORGANISM OR THE LIKE**

Pub. No.: 2002-348291 A]

Published: December 04, 2002 (20021204)

Inventor: NAKAMURA MASAYA

HISHIYAMA SHOJIRO

Applicant: FORESTRY & FOREST PRODUCTS RESEARCH INSTITUTE

Application No.: 2002-082993 [JP 200282993]

Filed: March 25, 2002 (20020325)

Priority: 2001-085225 [JP 200185225], JP (Japan), March 23, 2001 (20010323)

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new compound for searching an organism or the like decomposing dioxins easily.

SOLUTION: This new dioxin analog is expressed by formulas 1 and 2.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

351.15059868 \$6.37 US

Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

6/3,AB,LS/2 (Item 1 from file: 351)

015059868

WPI Acc No: 2003-120384/200311

XRAM Acc No: C03-030979

XRPX Acc No: N03-095978

**New dioxin analogs useful for searching out
dioxin-decomposing organisms**

Patent Assignee: DOKURITSU GYOSEI HOJIN SHINRIN SOGO KENK (DOKU-N);
HISHIYAMA S (HISH-I); NAKAMURA M (NAKA-I); FORESTRY & FORESTRY PROD RES
(NORQ)

Inventor: HISHIYAMA S; NAKAMURA M

Number of Countries: 003 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200276972	A1	20021003	WO 2001JP2627	A	20010329	200311 B
JP 2002348291	A	20021204	JP 200282993	A	20020325	200311
US 20040115836	A1	20040617	WO 2001JP2627	A	20010329	200440
			US 2003472382	A	20030923	

Priority Applications (No Type Date): JP 200185225 A 20010323

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 200276972	A1	J	24	C07D-319/24	
--------------	----	---	----	-------------	--

Designated States (National): DE US

JP 2002348291	A		10	C07D-493/04	
---------------	---	--	----	-------------	--

US 20040115836	A1			C07D-311/02	
----------------	----	--	--	-------------	--

Abstract (Basic): WO 200276972 A1

Abstract (Basic):

NOVELTY - Dioxin analogs (I) and (II) are new.

DETAILED DESCRIPTION - Dioxin analogs of formulae (I) and (II) are new.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) A searching method for dioxin-decomposing organisms, dioxin-decomposing enzyme or genes thereof, using a dioxin analog of formula (III) to react with organisms, enzyme or genes which generates luminescence on reaching certain targets.

(2) A similar method where (IV) is used.

(3) Kits to carry out the method.

X=Cl;

m, n=1-4;

R1, R2=H or 1-3C alkyl.

USE - The compounds are used for searching out dioxin-decomposing organisms.

ADVANTAGE - The method is quick and simple and has high sensitivity.

pp; 24 DwgNo 0/0

JP 2002-348291 A

[Claim 3] A method of searching a dioxin degrading microorganism, dioxin degrading enzyme, or dioxin degrading enzyme gene characterized by comprising: reacting a targeted microorganism, enzyme, or enzyme gene with a dioxin analogue compound represented by a general formula (3) as a substrate; and using fluorescent emission of metabolites as an index

(wherein, X represents a chlorine atom; m represents an integer of 0 to 4; and R¹ represents a hydrogen atom or a lower alkyl group having 1 to 3 carbon atoms).

[Claim 4] The search method according to claim 3, wherein the dioxin analogue compound represented by the general formula (3) is represented by a chemical formula (1).

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-348291

(P 2 0 0 2 - 3 4 8 2 9 1 A)

(43) 公開日 平成14年12月4日(2002.12.4)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C07D493/04	106	C07D493/04	106 C 2G043
319/24		319/24	2G054
G01N 21/64		G01N 21/64	Z 4C071
21/77		21/77	D
21/78		21/78	C
		審査請求 未請求 請求項の数10	O L (全10頁)

(21) 出願番号 特願2002-82993(P 2002-82993)

(22) 出願日 平成14年3月25日(2002.3.25)

(31) 優先権主張番号 特願2001-85225(P2001-85225)

(32) 優先日 平成13年3月23日(2001.3.23)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 501186173

独立行政法人 森林総合研究所

茨城県稲敷郡茎崎町松の里1

(72) 発明者 中村 雅哉

茨城県稲敷郡茎崎町松の里1 独立行政法

人 森林総合研究所内

(72) 発明者 菱山 正二郎

茨城県稲敷郡茎崎町松の里1 独立行政法

人 森林総合研究所内

(74) 代理人 100067541

弁理士 岸田 正行 (外2名)

最終頁に続く

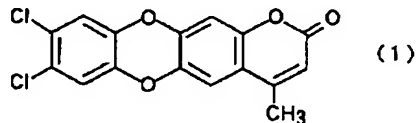
(54) 【発明の名称】 新規ダイオキシン類縁化合物、ダイオキシン類分解生物等の検索方法および検索キット

(57) 【要約】

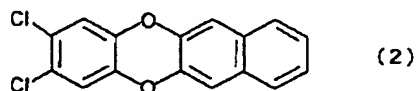
【課題】 簡便にダイオキシン類を分解する生物等を検索するための新規化合物を提供する。

【解決手段】 下記化学式(1)、(2)で示される新規ダイオキシン類縁化合物。

【化1】



【化2】

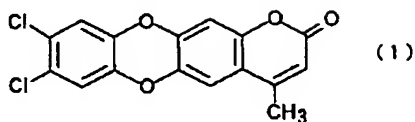


1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化学式(1)

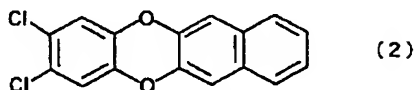
【化1】



で示される新規ダイオキシン類縁化合物。

【請求項2】 化学式(2)

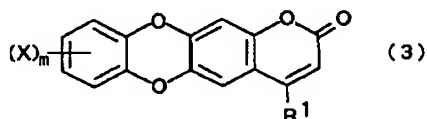
【化2】



で示される新規ダイオキシン類縁化合物。

【請求項3】 ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子を検索する方法であって、一般式(3)

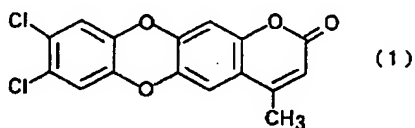
【化3】



(ただし式中、Xは塩素原子を表し、mは0～4の整数を表し、R¹は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を基質とし、検索対象となる生物、酵素または酵素遺伝子を用い、代謝物の蛍光発光を指標とすることを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索方法。

【請求項4】 前記一般式(3)で示されるダイオキシン類縁化合物が、化学式(1)

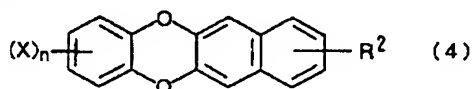
【化4】



で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする請求項3に記載の検索方法。

【請求項5】 ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子を検索する方法であって、一般式(4)

【化5】



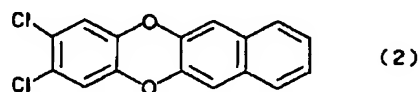
(ただし式中、Xは塩素原子を表し、nは0～4の整数を表し、R²は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を基質とし、検索対象となる生物、酵素、酵素遺伝子を用い、代謝物の蛍光発光を指標とすることを特徴とする

2

ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索方法。

【請求項6】 前記一般式(4)で示されるダイオキシン類縁化合物が化学式(2)

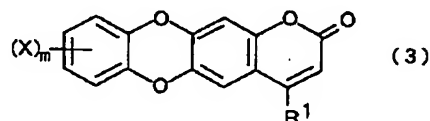
【化6】



で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする請求項5に記載の検索方法。

【請求項7】 一般式(3)

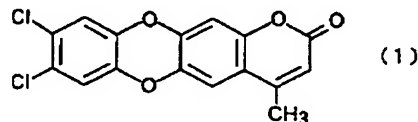
【化7】



(ただし式中、Xは塩素原子を表し、mは0～4の整数を表し、R¹は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を含むことを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索用キット。

【請求項8】 前記一般式(3)で示されるダイオキシン類縁化合物が化学式(1)

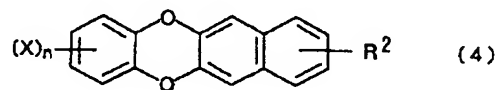
【化8】



で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする請求項7に記載の検索用キット。

【請求項9】 一般式(4)

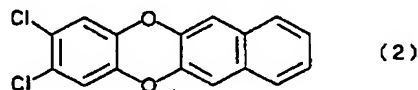
【化9】



(ただし式中、Xは塩素原子を表し、nは0～4の整数を表し、R²は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を含むことを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索用キット。

【請求項10】 前記一般式(4)で示されるダイオキシン類縁化合物が化学式(2)

【化10】



で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする請求項9に記載の検索用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

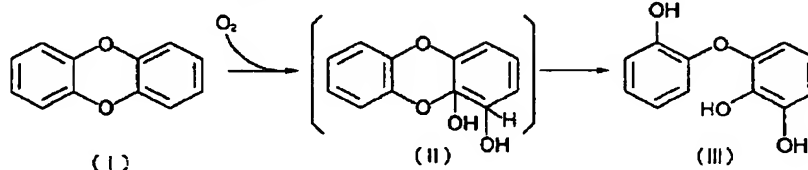
【発明の属する技術分野】本発明は、新規なダイオキシン類縁化合物、ダイオキシン類分解生物等を検索する方法およびダイオキシン類分解生物等検索キットに関するものである。

【0002】

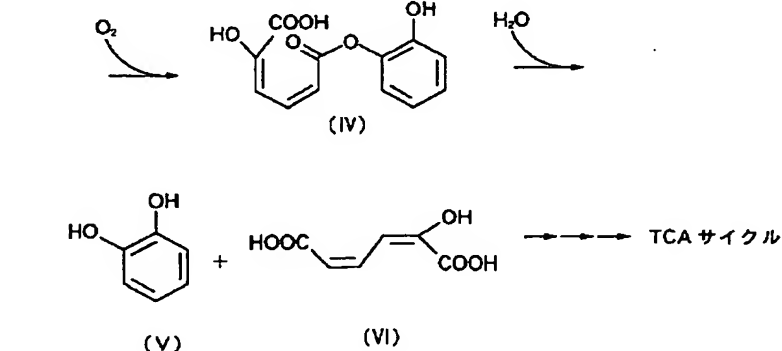
【従来の技術】ダイオキシン類は、その毒性および環境残留性から、近年ダイオキシン類による環境汚染が社会問題化しているが、未だダイオキシン類の実用的で効率的な除去法は見出されていない。特に低濃度で広範囲に存在するダイオキシン類の汚染の場合、汚染物を集積して物理的または化学的に処理する方法は非常に困難であると考えられている。このような低濃度の汚染の処理には、生物機能を応用した生物的環境浄化法（バイオメデレーション）が最も有効であると考えられ、自然界よりダイオキシン類を迅速かつ強力に分解・代謝・無毒化できる生物を検索し、単離し、環境修復系を構築することが急務となっている。

【0003】従来、ダイオキシン類分解生物の検索には、ダイオキシン類自身または放射能ラベル化合物を用いて生分解力を評価して選抜する方法が知られてい

ターミナル ジオキシゲナーゼ



エキストラジール ジオキシゲナーゼ



- (I) ジベンゾ-p-ジオキシン
- (II) ジベンゾ-p-ジオキシン-cis-ジヒドロジオール
- (III) 2,2',3'-トリヒドロキシジフェニルエーテル
- (IV) 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-(2-ヒドロキフェノキシ)-ヘキサ-2,4-ジエノエート
- (V) カテコール
- (VI) 2-ヒドロキシ-cis,cis-ムコン酸

【0008】本発明者らは、上記反応式で示されるジベンゾ-p-ジオキシンの生分解経路に着目し、ジベンゾ-p-ジオキシンの方のベンゼン環を、ベンゼン環を有する蛍光を発する化合物に置換したダイオキシン類縁

る。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来のダイオキシン類分解生物の検索方法には、生分解力評価に前処理操作が必要であったり、放射能ラベル化合物の特殊な分析施設が必要であったり、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いた機器分析に時間を要するという欠点があった。

【0005】本発明が解決しようとする課題は、従来のダイオキシン類分解生物の検索法の欠点を解消し、より簡便にダイオキシン類を分解する生物等を検索する方法、検索のための化合物および検用のキットを提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】ダイオキシン類の生物分解において、例えばジベンゾ-p-ジオキシン分解菌による一般的な分解経路では、下記反応式に示したようにダイオキシン類の基本骨格であるジベンゾ-p-ジオキシンのエーテル結合の開裂が律速となる。

【0007】

【化11】

化合物を基質とし、分解代謝物の蛍光を指標とすることにより対象となる生物、酵素、酵素遺伝子がダイオキシン類分解能を有するかどうかのスクリーニングを容易に行えることを見出し、本発明を完成するに至った。

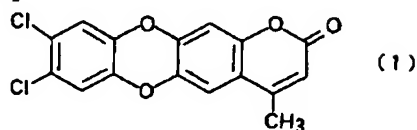
5

【0009】すなわち、本発明は以下(1)～(10)の発明に関するものである。

【0010】(1) 化学式(1)

【0011】

【化12】

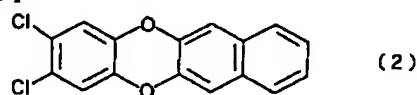


【0012】で示される新規ダイオキシン類縁化合物。

【0013】(2) 化学式(2)

【0014】

【化13】



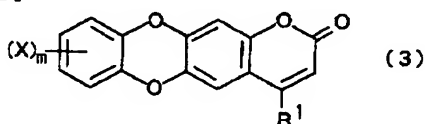
【0015】で示される新規ダイオキシン類縁化合物。

【0016】(3) ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子

を検索する方法であって、一般式(3)

【0017】

【化14】



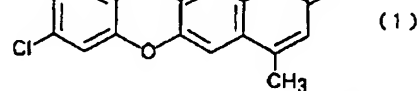
【0018】(ただし式中、Xは塩素原子を表し、mは0～4の整数を表し、R¹は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を基質とし、検索対象となる生物、酵素または酵素遺伝子

を作用させ、代謝物の蛍光発光を指標とすることを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索方法。

【0019】(4) 前記一般式(3)で示されるダイオキシン類縁化合物が、化学式(1)

【0020】

【化15】



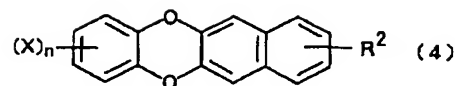
【0021】で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする前記(3)項に記載の検索方法。

【0022】(5) ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子を検索する方法であって、一般式(4)

【0023】

【化16】

6



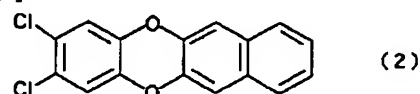
【0024】(ただし式中、Xは塩素原子を表し、nは0～4の整数を表し、R²は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を基質とし、検索対象となる生物、酵素、酵素遺伝子

を作用させ、代謝物の蛍光発光を指標とすることを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索方法。

【0025】(6) 前記一般式(4)で示されるダイオキシン類縁化合物が化学式(2)

【0026】

【化17】

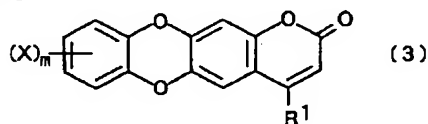


【0027】で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする前記(5)項に記載の検索方法。

【0028】(7) 一般式(3)

【0029】

【化18】

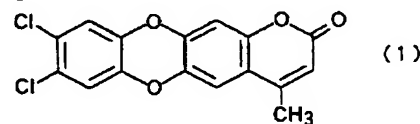


【0030】(ただし式中、Xは塩素原子を表し、mは0～4の整数を表し、R¹は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類縁化合物を含むことを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索用キット。

【0031】(8) 前記一般式(3)で示されるダイオキシン類縁化合物が化学式(1)

【0032】

【化19】

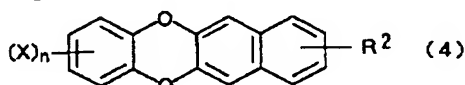


【0033】で示されるダイオキシン類縁化合物であることを特徴とする前記(7)項に記載の検索用キット。

【0034】(9) 一般式(4)

【0035】

【化20】



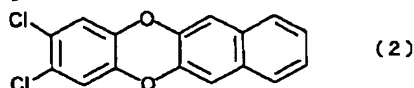
【0036】(ただし式中、Xは塩素原子を表し、nは

0～4の整数を表し、R²は水素原子または炭素数1～3の低級アルキル基を表す)で示されるダイオキシン類緑化合物を含むことを特徴とするダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索用キット。

【0037】(10) 前記一般式(4)で示されるダイオキシン類緑化合物が化学式(2)

【0038】

【化21】



【0039】で示されるダイオキシン類緑化合物であることを特徴とする前記(9)項に記載の検索用キット。

【0040】

【発明の実施の形態】本発明において、ダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素およびダイオキシン類分解酵素遺伝子により分解されるダイオキシン類とは、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ

[b, e] ジオキシンを初めとするポリクロロジベンゾ-p-ジオキシンである。

【0041】本発明において、前記化学式(1)および化学式(2)で示されるダイオキシン類緑化合物は、新規化合物である。

【0042】前記化学式(1)で示される新規ダイオキシン類緑化合物は、例えば不活性ガス雰囲気下に、ヘキサメチルりん酸トリアミド(HMPA)等の溶媒中で、水素化ナトリウムとクラウンエーテル(18-Crown-6)の存在下で、4-メチルエスクレチンと1, 2, 4, 5-テトラクロロベンゼンを反応させることにより得られる。

【0043】前記化学式(2)で示される新規ダイオキシン類緑化合物は、例えば不活性ガス雰囲気下に、ヘキサメチルりん酸トリアミド(HMPA)等の溶媒中で、水素化ナトリウムとクラウンエーテル(18-Crown-6)の存在下で、2, 3-ジヒドロキシナフタレンと1, 2, 4, 5-テトラクロロベンゼンを反応させることにより得られる。

【0044】本発明のダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素およびダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索方法は、前記一般式(3)で示されるダイオキシン類緑化合物(以下、エスクレチン型ダイオキシン類緑化合物と呼ぶ)または一般式(4)で示されるダイオキシン類緑化合物(以下、ナフタレン型ダイオキシン類緑化合物と呼ぶ)を基質として、ダイオキシン類分解生

物、ダイオキシン類分解酵素、ダイオキシン類分解酵素遺伝子を作用させ、代謝物の蛍光の有無により、対象とする生物、酵素または酵素遺伝子がコードするタンパク質(酵素)がダイオキシン分解能を有するかどうかを評価するものである。

【0045】前記一般式(3)で示されるエスクレチン型ダイオキシン類緑化合物において、R¹は水素原子またはメチル基、エチル基、プロピル基の炭素数1～3の低級アルキル基を挙げることができるが、好ましくは前記化学式(1)の化合物を挙げることができる。

【0046】前記一般式(4)で示されるナフタレン型ダイオキシン類緑化合物において、R¹は水素原子またはメチル基、エチル基、プロピル基の炭素数1～3の低級アルキル基を挙げることができるが、好ましくは前記化学式(2)の化合物を挙げることができる。

【0047】本発明におけるダイオキシン類分解生物とは、ダイオキシン類をその生物の代謝系により二酸化炭素まで資化することができる生物またはその生物の代謝系、生物機能により解毒・無毒化、改質することができる生物を指す。

【0048】本発明におけるダイオキシン類分解酵素とは、ダイオキシン構造中のエーテル結合開裂に直接、間接的に関与する酵素類、および塩素化ダイオキシンの脱塩素、水酸化に直接、間接的に関与する酵素類を指す。

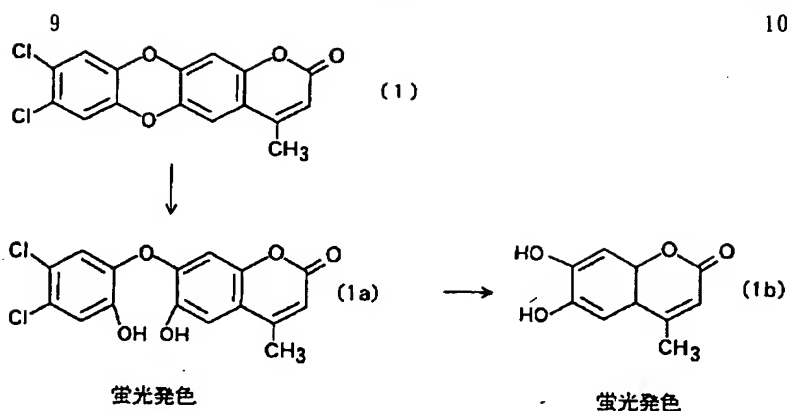
【0049】本発明におけるダイオキシン類分解酵素遺伝子とは、上記酵素タンパク質をコードする遺伝子、および調節タンパク質をコードする遺伝子、関連遺伝子を指す。

【0050】本発明のダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素を検索する方法は、前記エスクレチン型ダイオキシン類緑化合物または前記ナフタレン型ダイオキシン類緑化合物を基質として、検索対象となる生物等を作用させ、その分解代謝物の蛍光発光を指標とするものである。

【0051】ダイオキシン類緑化合物の分解代謝物の蛍光発光を指標として、検索対象生物等がダイオキシン類分解能を有するかどうかを判定できるのは、下記反応式に示すように、基質となる本発明のダイオキシン類緑化合物のジオキサン環のエーテル結合が開裂することにより生成する化合物(化学式(1a), (1b), (2a), (2b), (2c))が蛍光発光するためである。

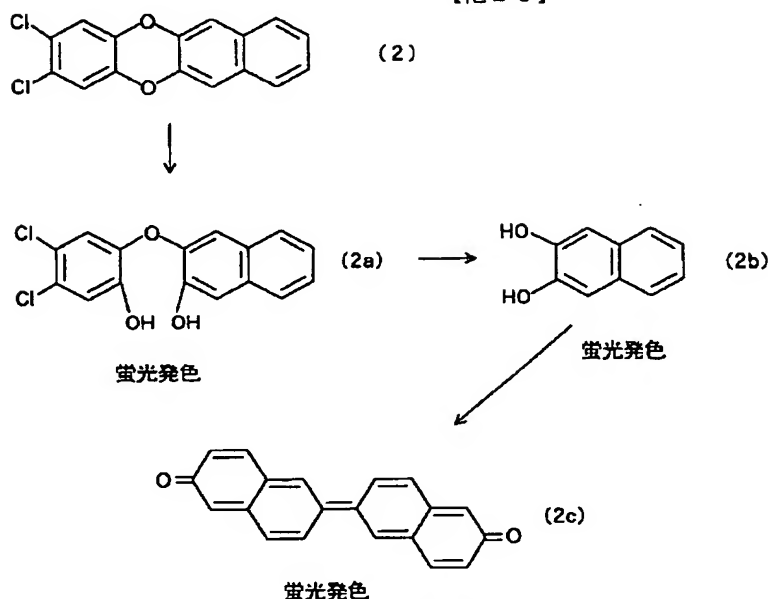
【0052】

【化22】



【 0 0 5 3 】

【 化 2 3 】



【 0 0 5 4 】 上記反応式に示した分解生成物のうち、エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物から分解生成する分解生成物（化学式（1 a）, （1 b））は、350～380 nmの励起光の照射により450～460 nmの蛍光発光を示し、ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物から分解生成する分解生成物（化学式（2 a）, （2 b）, （2 c））は、350～360 nmの励起光により400～450 nmの蛍光発光を示す。従って、エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物またはナフタレン型ダイオキシン類縁化合物を基質として検索対象の生物等を作用させて得られる分解代謝物に、350～380 nm（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物）または350～360 nm（ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）の励起光を照射し、450～460 nm（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物）または400～450 nm（ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）の蛍光発光を検出、測定することにより、検索対象の生物等がダイオキシン分解能を有していることを判定できる。蛍光発光を検出、測定する手段は、例えば、分光光度計を挙げることができる。すなわち、分解代謝物から450～460 nm（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物）

30 物）、400～450 nm（ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）の蛍光発光を検出、測定できたときは、その検索対象の生物等はダイオキシン分解能を有していることが判定できる。また、分解代謝物の蛍光発光を肉眼によって確認し、ダイオキシン分解能を有する生物等を選別してもよい。

【 0 0 5 5 】 本発明により、ダイオキシン類分解生物を検索する方法としては、培地に少量の有機溶媒に溶解した基質（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物またはナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）を添加し検索対象生物等と培養し、所定時間培養後、一部上清を採取し、アルカリ緩衝液（100 mMグリシン、100 mM水酸化ナトリウム pH 10）を加え希釈した後、蛍光分光光度計等により350～380 nm（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物）または350～360 nm（ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）の励起光で450～460 nm（エスクレチン型ダイオキシン類縁化合物）または400～450 nm（ナフタレン型ダイオキシン類縁化合物）の蛍光発光を検出、測定、または分光光度計により蛍光発光を検出、測定する。有機溶媒としてはDMSO、アセトン、等水溶性のものをを用い培地

40

50

に対する有機溶媒濃度が1%以上にならないように添加することが好ましい。培地に界面活性剤を添加する場合は非水溶性の有機溶媒、ノナン、ヘキサン等に基質を溶解し、最終濃度が濃度が1%を越えないように添加し、十分に攪拌し分散させればよい。

【0056】本発明により、ダイオキシン類分解酵素の検索する方法としては、ガラス製試験管に本基質を含む緩衝液(pH4~7)、分解能を有すると思われる生物の粗酵素(粗抽出液)、または分画操作した画分の酵素タンパク質を加え、所定時間反応後、その一部または全部を新たなガラス製試験管に移しにアルカリ緩衝液(100mMグリシン、100mM水酸化ナトリウム pH10)を加え、希釈した後、蛍光測定用石英セルに移し蛍光分光光度計等により、350~380nm(エスクレチン型ダイオキシン類緑化合物)または350~360nm(ナフタレン型ダイオキシン類緑化合物)の励起光を照射し、450~460nm(エスクレチン型ダイオキシン類緑化合物)または400~450nm(ナフタレン型ダイオキシン類緑化合物)の蛍光発光を測定、または分光光度計により発色を測定する。有機溶媒としてはDMSO、アセトン、等水溶性のものを反応液に対する有機溶媒濃度が1%以上にならないように添加した。反応液に界面活性剤を添加する場合は非水溶性の有機溶媒、ノナン、ヘキサン等に基質を溶解し、最終濃度が濃度が1%を越えないように添加し、十分に攪拌し分散させればよい。

【0057】本発明により、ダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索する方法としては、ダイオキシン分解能力の無い大腸菌等バクテリアや、酵母等真核微生物に、ダイオキシン分解能のある生物の遺伝子ライブラリーを導入し、形質転換生物を上記分解生物の検索方法に従い選別し、分解関連酵素遺伝子を特定する。

【0058】本発明のダイオキシン類分解生物、ダイオキシン類分解酵素またはダイオキシン類分解酵素遺伝子の検索キットは、前記一般式(3)で表されるエスクレチン型ダイオキシン類緑化合物または一般式(4)で表されるナフタレン型ダイオキシン類緑化合物を含むことを特徴とするものである。

【0059】ダイオキシン分解生物、分解酵素、分解酵素遺伝子検索キットは前述の検索方法を実施するために一般化されたものであり、前記エスクレチン型ダイオキシン類緑化合物またはナフタレン型ダイオキシン類緑化合物の基質の結晶、基質溶解用有機溶媒(DMSOまたはアセトン)、測定時添加用アルカリ緩衝液(100mMグリシン、100mM水酸化ナトリウム pH10.0)を含むもので、操作手順は前述に従って行う。

【0060】

【実施例】実施例1

窒素ガス雰囲気下、室温で4-メチルエスクレチン0.19g(1.0mM)、水素化ナトリウム(60%オ

ル懸濁液)0.072g(1.8mM)、クラウンエーテル(18-Crown-6)0.476g(1.8mM)、を4mlのヘキサメチルりん酸トリアミド(HMPA)に混合し、完全に溶解するまで攪拌した。次に、1, 2, 4, 5-テトラクロロベンゼン0.108g(0.5mM)を加え50℃で攪拌しながら十分に溶解した。溶解後、120℃、3時間反応させた。反応は随時薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3)によりモニターした。反応終了後、室温まで放冷し、酢酸エチル50mlで希釈後、飽和食塩水で反応溶液を3回洗浄し、有機層を減圧濃縮した。濃縮物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液 酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3)で精製し標記化合物の油状物0.12gを得た。油状物はクロロホルム、ヘキサンにより結晶化を行い、前記化学式(1)の化合物の結晶86mgを得た。得られた化合物の物性値を以下に示す。融点:296~298℃

¹H-NMR (δ: ppm) [CDCl₃]

2.34(3H, s), 6.19(1H, s), 6.82(1H, s), 6.96(1H, s), 6.99(1H, s), 7.02(1H, s)

¹³C-NMR (δ: ppm) [CDCl₃]

18.7, 105.1, 111.1, 114.0, 116.3, 117.8, 118.0, 127.1, 127.5, 137.9, 139.8, 140.4, 143.9, 150.5, 160.4

【0061】実施例2

窒素ガス雰囲気下、室温で2, 3-ジヒドロキシナフタレン0.16g(1.0mM)、水素化ナトリウム(60%オイル懸濁液)0.072g(1.8mM)、クラウンエーテル(18-Crown-6)0.476g(1.8mM)、を4mlのヘキサメチルりん酸トリアミド(HMPA)に混合し、完全に溶解するまで攪拌した。次に、1, 2, 4, 5-テトラクロロベンゼン0.108g(0.5mM)を加え50℃で攪拌しながら十分に溶解した。溶解後、130℃、3時間反応させた。反応は随時薄層クロマトグラフィー(展開溶媒 酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3)によりモニターした。反応終了後、室温まで放冷し、酢酸エチル50mlで希釈後、飽和食塩水で反応溶液を3回洗浄し、有機層を減圧濃縮した。濃縮物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液 酢酸エチル:n-ヘキサン=1:3)で精製し標記化合物の油状物0.098gを得た。油状物はヘキサンにより結晶化を行い、前記化学式(2)の化合物の結晶68mgを得た。得られた化合物の物性値を以下に示す。

融点:136~138℃

¹H-NMR (δ: ppm) [CDCl₃]

7.03(2H, s), 7.24(2H, s), 7.34(1H, s), 7.35(1H, s), 7.63(1H, s), 7.64(1H, s)

¹³C-NMR (δ: ppm) [CDCl₃]

112.5, 117.8, 125.7, 126.5, 126.9, 131.0, 140.6, 140.7

【0062】実施例3

数種の木材腐朽菌類 (アイアナタケ WD844 (*Grammothele fuligo* WD844)、カミウロコタケ WD1694 (*Phanerochaete crassa* WD1694)、ファネロケーテ クリソスポリウム ME446 (*Phanerochaete chrysosporium* ME446)、オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*)) を供試菌として、実施例 1 で得られたダイオキシン類緑化合物 (エスクレチン型) を用いたダイオキシン分解菌の検索を行った。

【0063】改変 NS 培地 (3% グルコース、1% ペプトン、無機塩類、pH 5.0) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに馬鈴薯寒天培地にて前培養した検索対象木材腐朽菌をコルクボーラーで打ち抜いたものを接種し、5 日～1 週間 28℃ で静置培養した。その後、最終基質濃度が 1 ppm となるように DMSO に溶かした基質 (実施例 1 で得られたエスクレチン型ダイオキシン類緑化合物) 溶液を 100 μ l 添加した。DMSO 濃度は培地に対して 1% で添加した。経時的 (1, 3, 5 日後) に培養液を採取し、その 100 μ l に対してアルカリ緩衝液 (100 mM グリシン、100 mM 水酸化ナトリウム pH 10.0) 1.9 ml を加え、励起光として長波長紫外線 (365 nm) を照射する事により蛍光を発するものを肉眼で選別した。培養 7 日目の蛍光強度を、蛍光分光光度計により励起波長 350 nm で、蛍光波長 450 nm の蛍光発光強度を測定した。その測定結果を表 1 に示す。なお、表中のコントロールとは、上記微生物培養用の培地にダイオキシン類緑化合物 (エスクレチン型) を加えただけのものである。

【0064】

【表 1】

検索対象菌体	蛍光強度
コントロール	1370
G.fuligo WD844	1639
P.crassa WD1694	1419
P.pulmonarius	2203
F.palustris	1314
C.versicolor	1601
P.chrysosporium ME446	1619

【0065】本基質を用いた木材腐朽菌の検索の結果、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) が強力に蛍光を発し、次いでアイアナタケ WD844 (*Grammothele fuligo* WD844)、ファネロケーテ クリソスポリウム ME446 (*Phanerochaete chrysosporium* ME446)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) となり、ダイオキシン分解性木材腐朽菌と認知されているカミウロコタケ ME446 (*Phanerochaete chrysosporium* ME446) よりも強い蛍光を示す木

材腐朽菌、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) が選別された。

【0066】実施例 4

数種の木材腐朽菌類 (アイアナタケ WD844 (*Grammothele fuligo* WD844)、カミウロコタケ WD1694 (*Phanerochaete crassa* WD1694)、ファネロケーテ クリソスポリウム ME446 (*Phanerochaete chrysosporium* ME446)、オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*)) を供試菌として、実施例 2 で得られたダイオキシン類緑化合物 (ナフタレン型) を用いたダイオキシン分解菌の検索を行った。

【0067】改変 NS 培地 (3% グルコース、1% ペプトン、無機塩類、pH 5.0) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに馬鈴薯寒天培地にて前培養した検索対象木材腐朽菌をコルクボーラーで打ち抜いたものを接種し、5 日～1 週間 28℃ で静置培養した。その後、最終基質濃度が 1 ppm となるように DMSO に溶かした基質 (実施例 1 で得られたエスクレチン型ダイオキシン類緑化合物) 溶液を 100 μ l 添加した。DMSO 濃度は培地に対して 1% で添加した。経時的 (1, 3, 5 日後) に培養液を採取し、その 100 μ l に対してアルカリ緩衝液 (100 mM グリシン、100 mM 水酸化ナトリウム pH 10.0) 1.9 ml を加え、励起光として長波長紫外線 (365 nm) を照射する事により蛍光を発するものを肉眼で選別した。その結果、最も発光強度の強い木材腐朽菌として、ウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) が選別された。

【0068】参考例 1

30 実施例 3 および実施例 4 で選別されたウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) のダイオキシン分解能を測定した。

【0069】実施例 3 および実施例 4 と同様にウスヒラタケ (*Pleurotus pulmonarius*) をグルコース-ペプトン培地にて培養し、培養 7 日目に 2, 3, 7, 8-テトラクロロダイオキシンを最終濃度 0.5 ppm となるように添加し、20 日間培養した。その後、培養菌体を含む培地を凍結乾燥し、ヘキサンで 16 時間環流抽出を行い、ヘキサンを留去後、100 ppm の Triton X-100 を含むメタノール 200 ml を加え 200 倍に希釈し、米国ケーブテクノロジー社の High Performance Dioxin Immunoassay Kit の説明書に従いダイオキシン濃度を測定し、ダイオキシン分解率を求めた。その結果を表 2 に示す。表中コントロールとは、上記微生物培養用の培地に 2, 3, 7, 8-テトラクロロダイオキシンを加えただけのものである。なお、ネガティブコントロールとしてオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) を用いた。

【0070】

【表 2】

40 含むメタノール 200 ml を加え 200 倍に希釈し、米

15

16

菌名	分解率
コントロール	0 %
ウスヒラタケ(Pleurotus pulmonarius)	31 %
オオウズラタケ(Fomitopsis palustris)	9 %

【0071】表2に示した結果から明らかなように、実施例3および実施例4で選別したウスヒラタケ(Pleurotus pulmonarius)がダイオキシン分解能を有することが分かる。なお、ダイオキシン分解能のないオオウズラタケ(Fomitopsis palustris)において9%の分解率が示されたが、これは分解ではなく、菌体への非特異的吸着により生じたものと考えられる。

【0072】参考例2

本発明化合物のアッセイ基質としての有効性を検討するため、実施例3および4で本発明化合物を用いてスクリーニングされた菌株(木材腐朽菌)の塩素化ダイオキシン代謝能を放射性ラベル化ダイオキシンを用いて検討した。30ml容バイアル瓶にKirk Low N培地(Glucose 1%, Ammoniumtertrate 1.2mM, Kirk Salt solution 10ml/100ml, Kirk Salt solution: KH_2PO_4 20g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.3g/l, Thiamine 0.005g/l, trace element 1.66ml/l)を5ml入れ、寒天培地で培養した上述の菌株をコルクボーラーで打ち抜いたものを植菌し、28℃、5日間静置培養したところに放射活性が48.2mCi/mmolの2,3,7,8-tetrachloro[U- ^{14}C]dibenzo-p-dioxinを130ppbとなるように加えた。そしてゴム栓でバイアル瓶を密栓し再び28℃で定期的に酸素を送り込みつつ静置培養した。 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の回収及び放射活性の測定は、バイアル瓶に2本の注射針を刺しそれぞれにチューブを付けその一方を酸素ポンペに、他方を液体シンチレーションカウンター用のミニバイアル中の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 捕捉剤(シンチラミン)とシンチレーションカクテル(シンチゾル500)の混液につないだ。ポンペから100%酸素を送り込み微生物代謝により放出された $^{14}\text{C}\text{O}_2$ をミニバイアルに捕捉した後、その放射活性を液体シンチレーション

カウンターで測定した。この操作は経時的(7日毎)に行った。

【0073】本発明化合物をアッセイ基質として用いてスクリーニングにより選抜された木材腐朽菌Pleurotus pulmonariusのダイオキシン代謝能を検定するため、放出される $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を経時的に測定した。その結果を図1に示す。代謝実験開始後1週間目で $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を検出する事が出来、培養2週間目でも1週間目と同程度の $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を検出することが出来た。これより、本代謝実験により新規アッセイ基質を用いて選抜された菌株(Pleurotus pulmonarius)は塩素化ダイオキシン分解・代謝能を有することが確認され、本研究に用いたダイオキシン構造類似新規化合物を用いたスクリーニングの有効性が示された。

【0074】

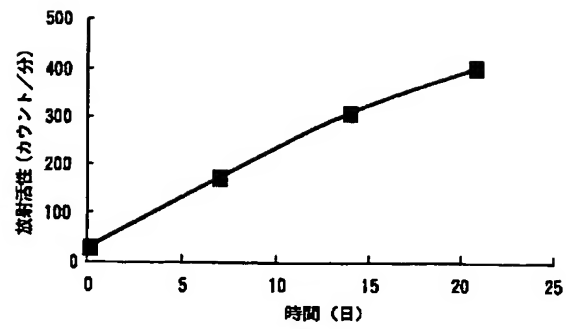
【発明の効果】本発明により、生物的環境浄化(バイオメディエーション)に適用するダイオキシン類を迅速かつ強力に分解・代謝・無毒化できる生物等を迅速、簡便、好感度に検索し、単離することができるので、社会問題化しているダイオキシン類汚染の環境修復技術の構築が可能となる。

【0075】また本発明により、生物等によるダイオキシン類分解・代謝系の生化学的解析(酵素化学的、動力学的、分子生物学的解析)が可能となり、環境浄化のための新規バイオリクター開発、タンパク質工学による酵素蛋白の高機能化、分解系機能獲得のための分子進化の基礎データを蓄積することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】参考例2における、木材腐朽菌Pleurotus pulmonariusのダイオキシン代謝能の測定結果を示すグラフ。

【図 1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA03 DA02 EA01
FA06 GA07 GB21 JA01 KA02
KA03 KA05 LA01
2G054 AA10 AB10 BA02 CA20 CA28
EA03 FB01
4C071 AA01 AA08 BB01 BB06 CC13
EE01 FF17 GG01 HH01 HH09
KK01 LL10